

**Міністерство освіти і науки України  
Тернопільський національний технічний університет  
імені Івана Пулюя**

**Кафедра харчової  
біотехнології та хімії**

**Методичні вказівки  
до проведення лабораторних робіт з курсу  
«Протеїни молока та біологічно активні  
продукти їхнього протеолізу»**

**для здобувачів ступеня доктора філософії за  
спеціальністю 181 «Харчові технології»**

**Тернопіль 2021**

Методичні вказівки до проведення лабораторних робіт з курсу «Протеїни молока та біологічно активні продукти їхнього протеолізу» для здобувачів ступеня доктора філософії за спеціальністю 181 «Харчові технології». – Тернопіль: ТНТУ, 2021. – 32 с.

Укладачі: д.б.н., проф. Юкало В.Г.  
к.т.н., доц. Сторож Л.А.

Рецензент: д.б.н., проф. Столяр О.Б.

## **Вступ**

Лабораторний практикум побудований відповідно до робочої програми навчальної дисципліни «Протеїни молока та біологічно активні продукти їхнього протеолізу» для здобувачів ступеня доктора філософії за спеціальністю 181 «Харчові технології». При цьому враховані сучасні дані про біологічно активні сполуки, які специфічні лише для молока, а також ті, що можуть утворюватися з природних компонентів у процесі виробництва молочних продуктів і впливати на різні біологічні системи організму.

## Лабораторна робота №1

### ВИДІЛЕННЯ ПОПЕРЕДНИКІВ БІОАКТИВНИХ ПЕПТИДІВ З ПРОТЕЇНІВ КАЗЕЇНОВОГО КОМПЛЕКСУ ОСАДЖЕННЯМ

Мета роботи: ознайомитися з методикою виділення казеїнових фракцій  $\alpha_s$ -CN і  $\beta$ -CN шляхом диференційного осадження; отримати відповідні препарати.

#### Теоретичні відомості

Казеїни – це фосфопротеїни, які осаджуються у сирому знежиреному молоці при підкисленні його до pH 4,6 при 20°C. При цьому в сироватці залишаються інші протеїни молока, непротеїнові азотисті речовини і частина мінеральних речовин, що були зв'язані з казеїнами. Казеїн складається з чотирьох головних і ряду міnorних протеїнових фракцій (рис. 1.1):

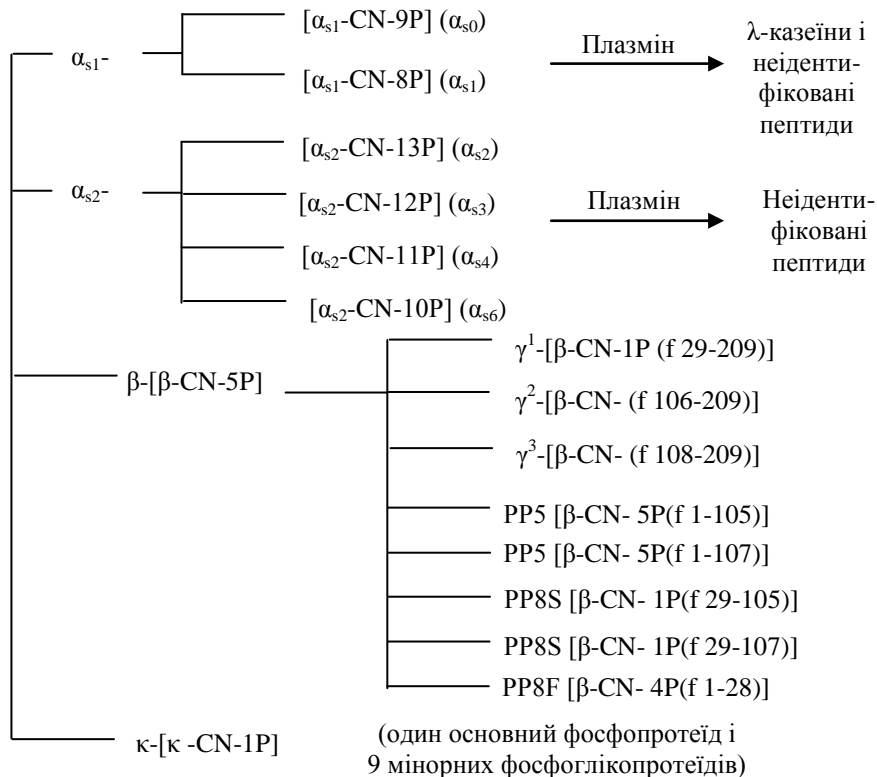


Рис. 1.1 – Гетерогенність коров'ячого казеїну

На сьогоднішній день досягнуто значного прогресу у вивченні будови і фізико-хімічних властивостей казеїнів, з'ясовано їх фракційний склад, визначено первинну структуру, є певні успіхи у встановленні просторової будови цього протеїну, запропоновано моделі казеїнових міцел, які дозволяють адекватно відобразити біохімічні перетворення казеїнів від їх синтезу до розщеплення під час травних процесів у шлунково-кишковому тракті ссавців.

В роботах останніх років було встановлено, що окрім основної функції – протеїнового живлення, казеїни здатні впливати на фізіологічні функції різних систем організму. Така регуляція може здійснюватись на рівні продуктів його обмеженого протеолізу у процесі нормального травлення протеолітичними ензимами шлунково-кишкового тракту. Було відкрито казеїнові пептиди, які впливають на серцево-судинну (антитромботичні й антигіпертензивні), нервову (агоністи та антагоністи опіоїдних рецепторів), травну, імунну (імуномодуляторні та антимікробні пептиди) системи. Встановлено також, що біоактивні пептиди можуть утворюватись з казеїнів у протеїнових продуктах за дії ензимів протеолітичних систем молочнокислих бактерій і молокозгортальних препаратів. Отримані результати спричинили подальший розвиток і розширення уявлень про біологічну цінність протеїнів у харчуванні, зокрема природних харчових протеїнів – казеїнів, котрі окремі автори називають харчовими прогормонами.

Оскільки біологічно активні пептиди різної дії утворюються з різних фракцій протеїнів казеїнового комплексу, тому першою стадією для їх отримання є виділення окремих казеїнових фракцій, які є попередниками певних груп біоактивних пептидів.

В даній лабораторній роботі для виділення основних попередників біоактивних пептидів з протеїнів казеїнового комплексу, а саме  $\alpha$ -CN і  $\beta$ -CN, використано відмінності у їх стійкості в розчинах у присутності сечовини.

## **Експериментальна частина**

Матеріали, реактиви, обладнання: рН-метр, термостат, центрифуга, центрифужна вага, центрифужні пробірки, мірні склянки

на 50, 100, 200 мл, піпетки на 1 мл, свіже молоко, дистильована вода, 1 Н НСІ, 1 Н NaOH, 7%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 6,6 М сечовина.

### **Хід роботи**

I стадія виділення включає отримання загального казеїну. Під поняттям «загальний казеїн» розуміють препарат, який складається з основних і міnorних фракцій  $\alpha_{\text{S1}}\text{-CN}$ ,  $\alpha_{\text{S2}}\text{-CN}$ ,  $\beta\text{-CN}$ ,  $\kappa\text{-CN}$ , а також включає великі фрагменти  $\beta\text{-CN}$  –  $\beta\text{-CN-1P}$  (f 29-209),  $\beta\text{-CN-1P}$  (f 106-209) і  $\beta\text{-CN-1P}$  (f 108-209). У процесі виділення загального казеїну з молока його очищають від ліпідів, протеїнів сироватки молока, низькомолекулярних пептидів протеозо-пептонної фракції, вуглеводів, низькомолекулярних органічних і неорганічних сполук. В основу виділення загального казеїну покладено ізоелектричне осадження при рН 4,6.

Виділення проводиться за наступною схемою:

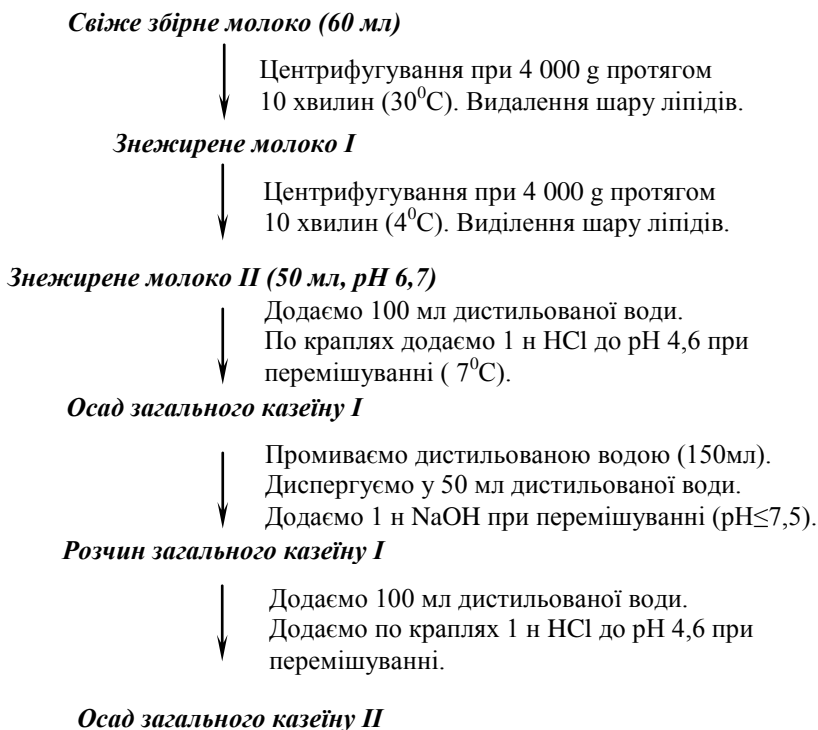


Рис 1.2 – Схема виділення загального

II стадія виділення – виділення  $\alpha_S$ -казеїнів. При цьому  $\alpha_S$ -казеїни відділяють від  $\beta$ -казеїну і його фрагментів.

Виділення проводиться за наступною схемою:

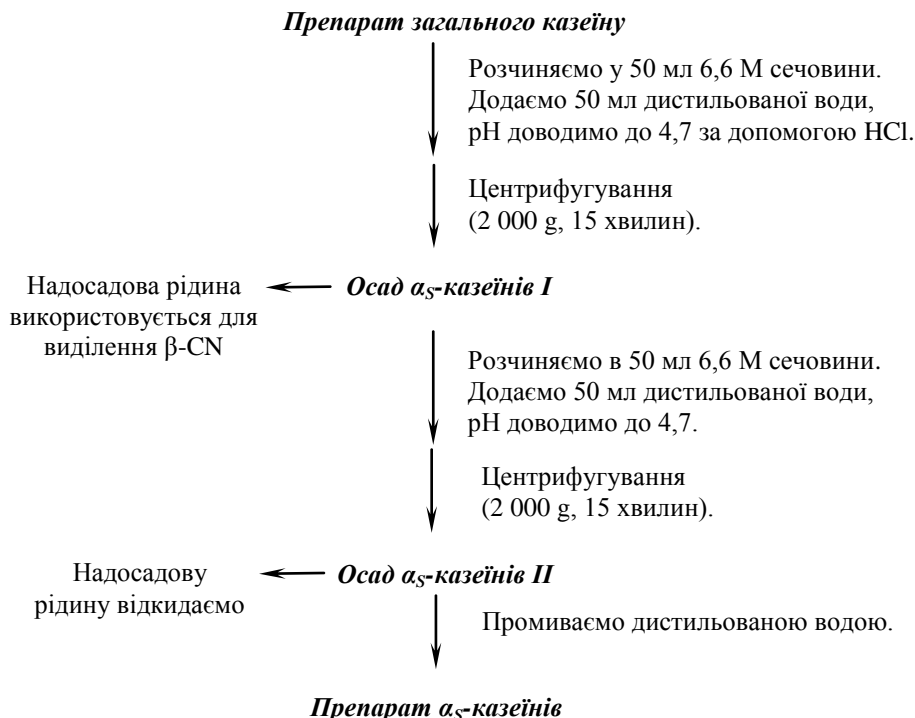


Рис 1.3 – Схема виділення  $\alpha_S$ -казеїнів

III стадія виділення – виділення  $\beta$ -казеїнів. Для виділення була використана властивість  $\beta$ -казеїну розчинятися у присутності 3,3 М сечовини при рН 4,6. В таких умовах  $\alpha_S$ -казеїни осаджуються. Першу стадію виділення  $\alpha_S$ -казеїнів використовуємо для отримання  $\beta$ -казеїну (див. рис. 1.3).

Виділення проводиться за наступною схемою:

**Розчин  $\beta$ -казеїну у 3,3 М сечовині  
(90 мл рН 4,7)**

↓ рН доводимо до 4,9 за допомогою 1 Н NaOH (ізоелектрична точка  $\beta$ -казеїну).

↓ Додаємо 180 мл дистильованої води.  
↓ Підігріваємо до 30<sup>0</sup>С.  
↓ Відстоювання в термостаті.

↓ Центрифугування надосадової рідини протягом 30 хвилин (2 000 g).

**Осад  $\beta$ -казеїну I**

↓ Осад диспергуємо в 20 мл 3,3 М сечовини.

↓ Доводимо рН до 7,5 за допомогою 1 Н NaOH до утворення каламутного розчину  $\beta$ -казеїну.

↓ Додаємо 1Н HCl до рН 4,6.  
↓ Нагріваємо до температури 37<sup>0</sup>С.

↓ Дрібнозернистий осад відцентрифугуємо при 2000 g протягом 15 хвилин.  
↓ Фільтруємо надосадову рідину.

Осад відкидаємо  
(містить  
переважно  
 $\alpha_s$ -CN і  $\kappa$ -CN)

**Розчин  $\beta$ -казеїну II**

↓ Доводимо рН до 4,9 1 Н NaOH.  
↓ Доводимо об'єм до 400 мл дистильованою водою.

↓ Нагріваємо диспергований  $\beta$ -CN до 30<sup>0</sup>С (відбувається формування осаду).

↓ Осад відцентрифугуємо протягом 15 хвилин при 2000 g.

**Препарат  $\beta$ -казеїну**

Рис 1.4 – Схема виділення  $\beta$ -казеїну



Отримані препарати загального казеїну,  $\alpha_S$ -казеїнів і  $\beta$ -казеїну можна аналізувати методом електрофорезу для визначення фракційного складу і встановлення їх гомогенності.

Фракції  $\alpha_S$ -казеїнів і  $\beta$ -казеїну можуть бути використані для протеолізу і виділення біоактивних пептидів.

### **Контрольні запитання**

1. Які фракції входять до складу протеїнів казеїнового комплексу?
2. З якою метою необхідно виділяти окремі фракції казеїну?
3. Який принцип покладено в основу виділення загального казеїну з молока?
4. Які властивості  $\alpha_S$ - і  $\beta$ -казеїнів використані для їх виділення?

## Лабораторна робота №2

### ПРЕПАРАТИВНИЙ ЕЛЕКТРОФОРЕЗ БІЛКІВ МОЛОКА

Мета роботи: ознайомитися з методикою препаративного електрофорезу; виділити електрофоретично чисті фракції протеїнів казеїнового комплексу

#### Теоретичні відомості

Для отримання попередників біологічно активних пептидів з протеїнів казеїнового комплексу молока використовують методи диференційного осадження, чутливість до іонів кальцію, різницю в температурі нестабільності казеїну, розчинність в присутності сечовини, здатність до самоасоціації, піноутворення та ін. Такі методи, як правило, реалізуються в багато стадій, громіздкі, довготривалі та не забезпечують повного очищення фракцій.

Для ефективного розділення казеїнових фракцій широко застосовується метод електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ). Цей метод покладено в основу сучасної класифікації протеїнів казеїнового комплексу молока. В лабораторії біохімії молока на кафедрі харчової біотехнології і хімії ТНТУ розроблено варіант аналітичного електрофорезу казеїну в ПААГ і виготовлено прилад (рис. 2.1), який дозволяє ідентифікувати всі протеїни казеїнового комплексу (рис. 2.2). Ця методика розглядається студентами напряму «Харчові технології» у лабораторному практикумі курсу «Біохімія». Вона була взята за основу для розробки методики препаративного варіанту електрофорезу в ПААГ, який дозволяє за одну стадію отримати електрофоретично чисті фракції казеїнових попередників біологічно активних пептидів з протеїнів казеїнового комплексу молока.

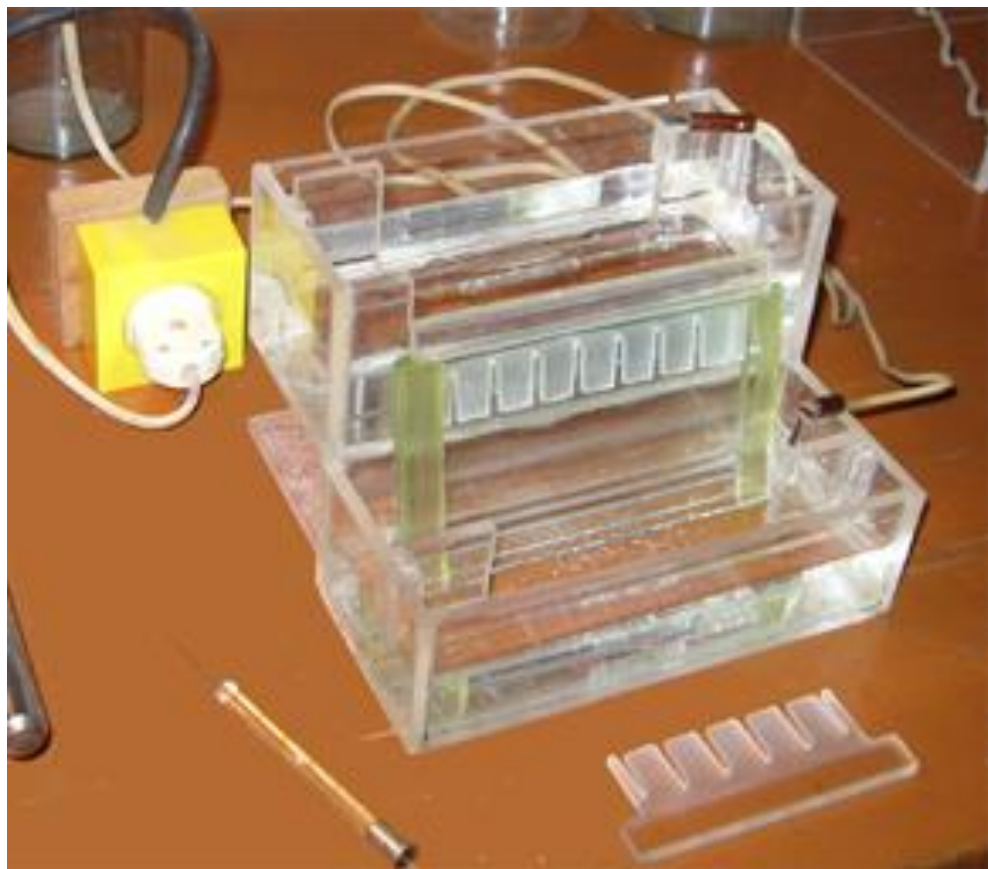


Рис. 2.1 – Прилад для проведення електрофорезу на вертикальних пластинках ПААГ

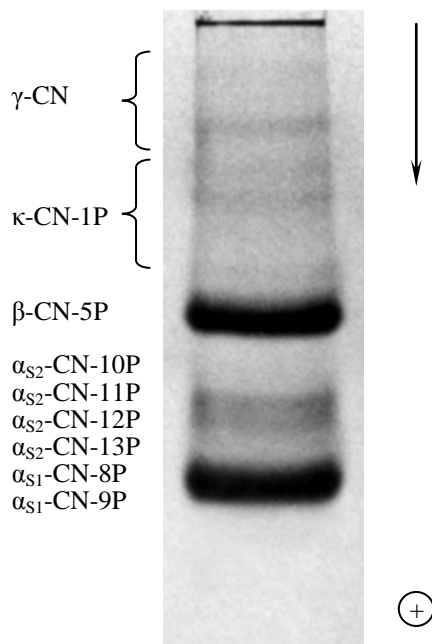


Рис. 2.2 – Електрофореграма загального казеїну, отримана з використанням лужної системи поліакриламідного в присутності сечовини (Юкало В., 2007)

### Експериментальна частина

Матеріали, реактиви, обладнання: протеїни казеїнового комплексу, акриламід, N,N'-метиленбісакриламід, персульфат амонію, N,N,N',N'-тетраметилендіамін, тріс(оксиметил)амінометан, етилендіамінтетраацетат натрію, карбамід, веронал, етиловий спирт, оцтова кислота, амідочорний 10 Б, бромфеноловий синій, сахароза, дистильована вода, прилад для електрофорезу, джерело постійного струму, фільтрувальний папір, аналітичні ваги, штатив з пробіркам, мірний циліндр на 50 мл, кристалізатор, ножиці, шприц для внесення проби.

## Хід роботи

Для електрофорезу протеїнів казеїнового комплексу використовують ПААГ з концентрацією акриламід 35 мг/мл, що забезпечує високу швидкість і ефективність розділення протеїнів. Буферний розчин для приготування гелю (рН 7,9) містить 0,025 М тріс(оксиметил)амінометан, 0,027 М веронал, 0,003 М етилендіамінтетраацетат натрію (ЕДТА  $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) і 4,5 М карбамід. Буферний розчин забезпечує високий негативний заряд на всіх молекулах казеїнів (рІ казеїну – 4,6) і відсутність агрегації білків за рахунок дії карбаміду та ЕДТА. Таким чином, для одержання гелю готують вихідні розчини:

- |    |                     |            |
|----|---------------------|------------|
| 1. | Акриламід           | – 14 г     |
|    | Метиленбісакриламід | – 0,75 г   |
|    | <hr/>               |            |
|    | Вода до 0,1 л       |            |
| 2. | Тріс                | – 6,05 г   |
|    | ЕДТА                | – 2,016 г  |
|    | Веронал             | – 11,135 г |
|    | Карбамід            | – 540 г    |
|    | <hr/>               |            |
|    | Вода до 1 л         |            |
| 3. | Персульфат амонію   | – 0,03 г   |
|    | ТЕМЕД               | – 0,05 мл  |
|    | <hr/>               |            |
|    | Вода до 0,01 л      |            |

Розчини 1 і 2 можуть зберігатися при 4°C протягом одного місяця. Розчин 3 готується безпосередньо перед дослідом. Кількість персульфату амонію підбирають таким чином, щоб забезпечити полімеризацію акриламід і утворення гелю протягом 30-40 хв. Гель одержують, змішуючи один об'єм розчину 1, два об'єми розчину 2 і один об'єм розчину 3.

Полімеризацію гелю проводять в робочій камері (100x90x4 мм).

Нижній отвір камери заклеюють плівкою. Для формування стартової комірки в камеру із залитим гелем вставляють формер для препаративного електрофорезу. Після полімеризації формер обережно, щоб не зруйнувати гель, витягують з камери.

### Підготовка проби

Проба готується шляхом розчинення протеїнів казеїнового комплексу в розведеному в два рази буфері (вихідний розчин 2). Для збільшення густини зразку додають кристали сахарози і в якості сигнального барвника – бромфеноловий синій.

Сигнальний барвник має більшу електрофоретичну рухливість, ніж молекули проби, і дозволяє спостерігати за ходом електрофорезу.

Склад проби:

<i>Назва компоненту</i>	<i>Кількість</i>
Казеїн	70 мг
Буфер (розчин 2)	1,5 мг
Дистильована вода	1,5 мг
Сахароза	200 мг
Бромфеноловий синій	0,02 мл

Зразок готують за декілька годин до електрофорезу і перед нанесенням на гель фільтрують.

### Проведення електрофорезу

Для проведення електрофорезу використовують прилад, виготовлений із органічного скла (рис. 2.1).

Робочу камеру з гелем встановлюють в нижню буферну камеру. В буферні камери і верхню частину робочої камери заливають електродний буфер (розведений в два рази вихідний розчин 2 без карбаміду).

Пробу вносять в стартову комірку в кількості 3 мл за допомогою шприца під буфер. Проба повинна рівномірно осісти на дно комірки. Від цього в значній мірі залежить якість розділення. Після нанесення проби з'єднують буферні розчини в робочій і верхній електродній камерах смужкою фільтрувального паперу і підключають електроди до джерела живлення. Електрофорез проводять при постійній силі струму – 50 мА. Коли сигнальний барвник досягне нижньої лінії гелю, відключають струм і дістають пластинку гелю для фіксації і забарвлення.

### Фіксація і забарвлення електрофореграми

Після закінчення електрофорезу камеру розклеюють при нагріванні, обережно дістають пластинку гелю, розміщують її в

кристалізаторі, заливають 1% розчином барвника (амідочорний 10 Б) в 7% розчині оцтової кислоти і витримують 15 хвилин. В результаті протеїни фіксуються в гелі і забарвлюються. Барвник, який не зв'язався з протеїнами, відмивають 7% розчином оцтової кислоти в 20 % етанолі, періодично змінюючи розчин, поки фон не стане повністю прозорим.

На одержаній фіксованій електрофореграмі ідентифікують фракції протеїнів по віддалі, яку вони проходять в гелі під час електрофорезу. Результати оформлюють у вигляді схеми електрофореграми.

При частковому забарвленні крайніх смужок електрофореграми пластинку гелю можна використати для екстракції гомогенних фракцій казеїнів. Екстракцію проводять розчином, який підходить для подальшого використанням фракцій.

Для кількісного аналізу електрофореграми піддають денситометрії (рис. 2.4).

Типова електрофореграма препаративного розділення протеїнів казеїнового комплексу наведена на рис. 2.3.

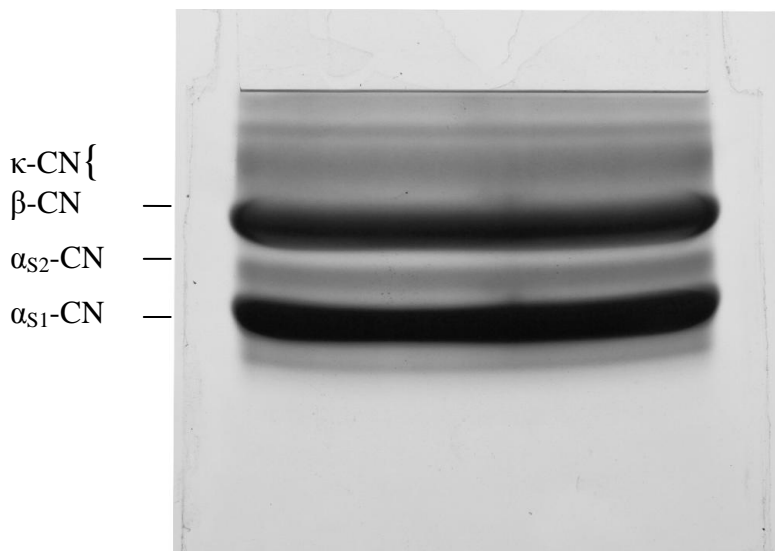


Рис. 2.3 – Електорофореграма загального казеїну в препаративному варіанті анодної електрофоретичної системи в однорідному ПААГ

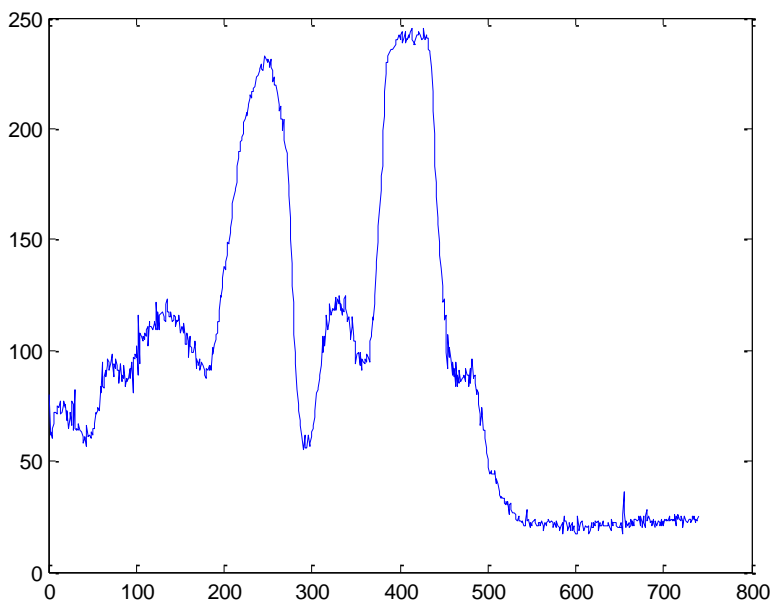


Рис. 2.4 – Денситограма електорофореграми (рис. 2.3)

### **Контрольні запитання**

1. В чому полягає явище електрофорезу?
2. В чому переваги електрофоретичних методів аналізу протеїнів?
3. У чому полягає відмінність препаративного електрофорезу від аналітичного?
4. Охарактеризуйте основні стадії електрофорезу?



### ОТРИМАННЯ КОМПЛЕКСНИХ ПРЕПАРАТІВ БІОАКТИВНИХ ПЕПТИДІВ ІЗ ПРОТЕЇНІВ СИРОВАТКИ МОЛОКА

Мета роботи: ознайомитися з методичними підходами, що використовуються при виділенні біологічно активних пептидів з протеїнів сироватки молока

#### Теоретичні відомості

До протеїнів сироватки молока належать протеїни молока, що залишилися у розчині після осадження казеїнів молока при рН 4,6 та температурі 20°C. За сучасною класифікацією до протеїнів сироватки молока належать  $\beta$ -лактоглобуліни ( $\beta$ -LG),  $\alpha$ -лактоальбуміни ( $\alpha$ -LA), альбуміни сироватки (BSA), імуноглобуліни (IG), лактоферин (LF), мінорні фракції протеїнів та протеозо-пептонна фракція (PPF) (рис. 3.1.).

Протеїни сироватки подібно до казеїнів є повноцінним джерелом амінокислот та характеризуються скором, який близький до скору «ідеального» харчового протеїну. Проте, на відміну від казеїнів, ці протеїни виконують ряд важливих функцій. Це транспортування жирних кислот і ретинолу, антиоксидантна дія ( $\beta$ -LG); участь у синтезі лактози у секреторних клітинах молочної залози, транспортування іонів кальцію, імуномодуляторна та антиканцерогенна дія ( $\alpha$ -LA); імунний захист (Ig); транспортна функція (BSA); зв'язування іонів заліза, антимікробна та антиоксидантна дія (LF).

Можливо це і було причиною того, що відкриття біоактивних пептидів, які утворюються в процесі протеолізу протеїнів сироватки молока, відбулось пізніше, ніж у казеїнів.

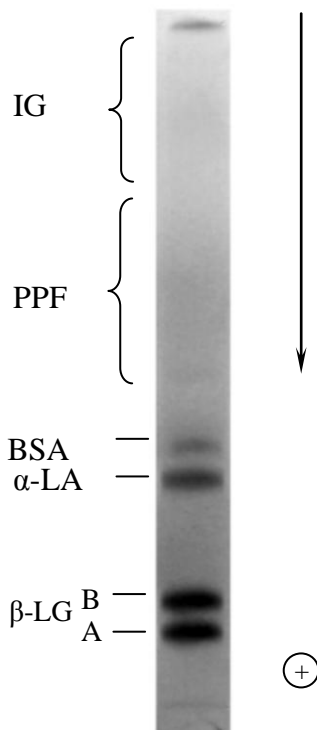


Рис. 3.1 – Електрофореграма білків сироватки коров'ячого молока, отримана з використанням диск-електрофорезу в ПААГ у нативних умовах

За сучасними даними з протеїнів сироватки молока корів до попередників біоактивних пептидів можна віднести  $\beta$ -лактоглобулін,  $\alpha$ -лактоальбумін, лактоферин. До потенційних попередників також належать імуноглобуліни. Узагальнені дані про відомі біоактивні пептиди з протеїнів сироватки молока корів наведені в табл. 3.1. Найбільший відсоток амінокислот, які входять до складу біоактивних пептидів, знайдено в  $\beta$ -лактоглобуліні (51%) і  $\alpha$ -лактоальбуміні (39%). Причому послідовності амінокислотних залишків, що відповідають біоактивних пептидам у цих протеїнах, розподілені рівномірно вздовж поліпептидного ланцюга. За видами біологічної дії серед біоактивних

Таблиця 3.1

## Біоактивні пептиди з протеїнів сироватки молока корів

№ п/п	Білок попередник, назва пептиду	Фрагмент первинної структури	Первинна структура біоактивного пептиду	Спосіб одержання	Біологічна дія
1	2	3	4	5	6
	<b>β-лакто-глобулін</b>	1-162			
1		9-14	Gly-Leu-Asp-Ile-Gln-Lys	Трипсин	Гіпохолестеро- лемічна
2		15-19	Val-Ala-Gly-Thr-Trp		Інгібітор АПФ
3	LGDT-2	15-20	Val-Ala-Gly-Thr-Trp-Tyr	Трипсин	Бактерицидна
4		22-25	Leu-Ala-Met-Ala		Інгібітор АПФ
5	LGDT-4	25-40	Ala-Ala-Ser-Asp-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Ala-Pro-Leu-Arg	Трипсин	Бактерицидна
6		32-40	Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Ala-Pro-Leu-Arg		Інгібітор АПФ
7		36-42	Ser-Ala-Pro-Leu-Arg-Val-Tyr	Протеаза N з <i>B.subtilis</i>	Інгібітор АПФ (8mM)
8		41-60	Val-Tyr-Val-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu-Ile-Leu-Leu-Gln-Lys	Трипсин	Гіпохолестеро- лемічна
9		71-75	Ile-Ile-Ala-Glu-Lys	Трипсин	Гіпохолестеро- лемічна
10		78-80	Ile-Pro-Ala	Протеїназа К Синтез	Інгібітор АПФ
11	LGDT-1	78-83	Ile-Pro-Ala-Val-Phe-Lys	Трипсин	Бактерицидна
12		81-83	Val-Phe-Lys		Інгібітор АПФ
13	LGDT-3	92-100	Val-Leu-Val-Leu-Asp-Thr-Asp-Tyr-Lys	Трипсин	Бактерицидна
14		94-100	Val-Leu-Asp-Thr-Asp-Tyr-Lys		Інгібітор АПФ
15		102-103	Tyr-Leu	Синтез	Інгібітор АПФ
16	β- лакторфін	102-105	Tyr-Leu-Leu-Phe	Трипсин Синтез	Інгібітор АПФ Опіодна
17	β-лактозин В	142-145	Ala-Leu-Pro-Met	Протеоліз	Інгібітор АПФ
18		142-146	Ala-Leu-Pro-Met-His	Трипсин	Гіпохолестеро- лемічна Інгібітор АПФ
19	β-лактокінін	142-148	Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg	Трипсин	Інгібітор АПФ
20		146-148	His-Ile-Arg		Інгібітор АПФ
21	β-лакто- тензин	146-149	His-Ile-Arg-Leu		Скорочення кишківника Інгібітор АПФ
22		147-148	Ile-Arg		Інгібітор АПФ

Продовження табл. 3.1

1	2	3	4	5	6
	<b><math>\alpha</math>-лакт-альбумін</b>	1-123			
1	LDT-1	1-5	Glu-Gln-Leu-Thr-Lys	Трипсин	Бактерицидна
2	LDT-2	17-31-S-S-109-114	Gly-Tyr-Gly-Gly-Val-Ser-Leu-Pro-Glu-Trp-Val- <b>Cys</b> -Thr-Thr-Phe   Ala-Leu- <b>Cys</b> -Ser-Gln-Lys	Трипсин	Бактерицидна
3	$\alpha$ -імуно-лактокінін	18-19	Tyr-Gly	Синтез	Імуномодуляторна Інгібітор АПФ
4		18-20	Tyr-Gly-Gly	Синтез	Імуномодуляторна
5	$\alpha$ -імуно-лактокінін	50-51	Tyr-Gly	Синтез	Імуномодуляторна Інгібітор АПФ
6		50-52	Tyr-Gly-Leu		Інгібітор АПФ
7	$\alpha$ -лакторфін	50-53	Tyr-Gly-Leu-Phe	Пепсин Синтез	Інгібітор АПФ Опіоїдна
8		51-53	Gly-Leu-Phe	Синтез	Імуномодуляторна
9	LDC	61-68-S-S-75-80	<b>Cys</b> -Lys-Asp-Asp-Gln-Asn-   -Pro-His Ile-Ser- <b>Cys</b> -Asp-Lys-Phe	Хімо-трипсин	Бактерицидна
10		99-108	Val-Gly-Ile-Asn-Tyr-Trp-Leu-Ala-His-Lys		Інгібітор АПФ
11		104-108	Trp-Leu-Ala-His-Lys	Трипсин	Інгібітор АПФ
12		109-114	Ala-Leu-Cys-Ser-Glu-Lys	Трипсин	Бактерицидна
	<b>Лактоферин</b>				
1		1-11-S-S-17-47	Ala-Pro-Arg-Lys-Asn-Val-Arg-Trp- - <b>Cys</b> <sup>1</sup> -Thr-Ile   Phe-Lys- <b>Cys</b> <sup>2</sup> -Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Thr-Cys-Val-Arg-Arg-Ala-Phe-Ala-Leu-Glu- <b>Cys</b> <sup>2</sup> -Ile-Arg	Пепсин	Бактерицидна
2		1-11-S-S-17-48	Ala-Pro-Arg-Lys-Asn-Val-Arg-Trp- - <b>Cys</b> <sup>1</sup> -Thr-Ile   Phe-Lys- <b>Cys</b> <sup>2</sup> -Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Thr-Cys-Val-Arg-Arg-Ala-Phe-Ala-Leu-Glu- <b>Cys</b> <sup>2</sup> -Ile-Arg-Ala	Хімозин	Бактерицидна
3		1-16-S-S-43-48	Ala-Pro-Arg-Lys-Asn-Val-Arg-Trp- <b>Cys</b> -Thr-Ile-Ser-Gln-Pro-Glu-Trp   Leu-Glu- - <b>Cys</b> -Ile-Arg-Ala	Пепсин	Бактерицидна

Продовження табл. 3.1

1	2	3	4	5	6
4		1-16-S-S-45-48	Ala-Pro-Arg-Lys-Asn-Val-Arg-Trp- <b>Cys</b> -Thr-Ile-Ser-Gln-Pro-Glu-Trp   <b>Cys</b> -Ile-Arg-Ala	Пепсин	Бактерицидна
5		1-42-S-S-43-48	Ala-Pro-Arg-Lys-Asn-Val-Arg-Trp- Cys-Thr-Ile-Ser-Gln-Pro-Glu-Trp- Phe-Lys- <b>Cys</b> <sup>1</sup> -Arg-Arg-Trp-Gln-Trp- Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro- Ser-Ile-Thr- <b>Cys</b> <sup>1</sup> -Val-Arg-Arg-Ala- Phe-Ala   Leu-Glu- <b>Cys</b> <sup>2</sup> -Ile-Arg-Ala	Пепсин	Бактерицидна
6		17-30	Phe-Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp- Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly	Синтез	Бактерицидна
7	Лактоферицин В	17-41/42	Phe-Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp- Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro- Ser-Ile-Thr-Cys-Val-Arg-Arg-Ala- Phe/Ala	Пепсин Хімозин	Бактерицидна Імуномодуляторна
8		19-37	Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met- Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-Ile- Thr-Cys-Val	Синтез	Бактерицидна
9	Лактоферампін	265-284	Asp-Leu-Ile-Trp-Lys-Leu-Leu-Ser- Lys-Ala-Gln-Glu-Lys-Phe-Gly-Lys- Asn-Lys-Ser-Arg	Синтез	Бактерицидна
	<b>Альбумін сироватки</b>				
1	Альбутензин А Серокінін	208-216	Ala-Leu-Lys-Ala-Trp-Ser-Val-Ala-Arg		Інгібітор АПФ Регулювання скорочення кишківника
2	Серофін	399-404	Tyr-Gly-Phe-Gln-Asn-Ala	Пепсин	Опіоїдний антагоніст

пептидів протеїнів сироватки молока знайдено інгібітори ангіотензин-перетворювального ензиму (АПЕ), пептиди з опіоїдною та бактерицидною дією, імуномодуляторні та гіпохолестеролемічні пептиди, а також пептиди, що впливають на моторику кишківника (рис. 3.2).

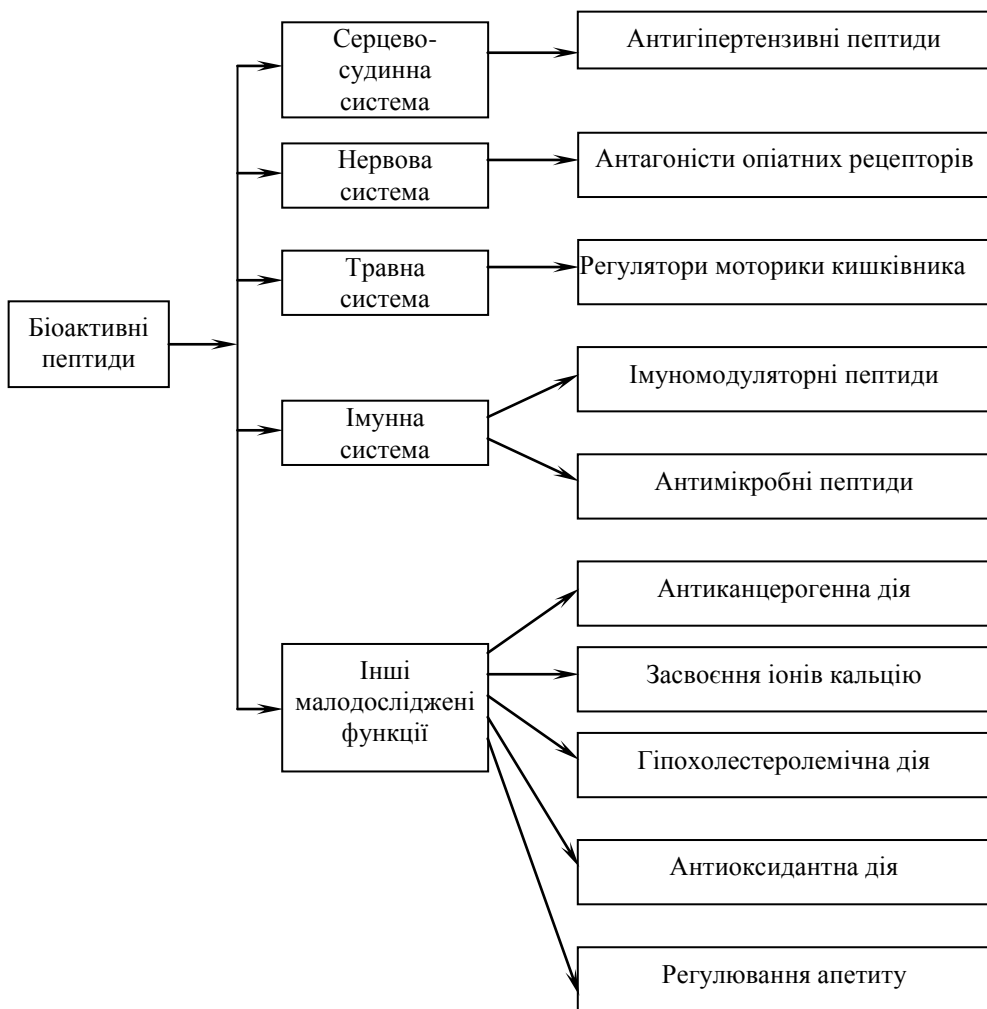


Рис. 3.2 – Функції біоактивних пептидів протеїнів сироватки молока

## Експериментальна частина

Виділення біоактивних пептидів з протеїнів сироватки молока включає дві або й три стадії. На першій стадії протеїни сироватки молока (або їх фракції) розщеплюють протеолітичними ензимами. При цьому отримують суміш пептидів, поліпептидів і нерозщеплених протеїнів. На другій стадії виділяють низькомолекулярну фракцію, яка містить суміш біоактивних пептидів – комплексний препарат. В окремих випадках проводиться подальше очищення з виділенням пептидів, які володіють певною біологічною дією, або індивідуальних препаратів.

Матеріали, реактиви, обладнання: технічна вага, аналітична вага, рН-метр, спектрофотометр СФ-46, водяний термостат, колонка для гель-фільтрації із сефадексом G-25 («Pharmacia», Швеція), центрифуга, центрифужні пробірки, центрифужна вага, конічні колби, хімічні склянки, пробірки, мірні пробірки на 10 мл, піпетки на 1, 5 мл, мірний циліндр на 25 мл, скляні лійки, фільтрувальний папір, концентрат сироваткових білків, ензимний препарат (панкреатин), дистильована вода, 1 Н NaOH, 10%  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  (ТХО), 5 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .

### Хід роботи

Приготування розчину субстрату. Із наважки протеїнів сироватки готують 20 мл 2% розчину в дистильованій воді. Концентрацію розчину розраховують спектрофотометричним методом в ультрафіолетовій області на спектрофотометрі СФ-46.

Проведення протеолізу. У розчині протеїнів сироватки додаванням 1 Н NaOH доводять рН до 7,9. Розчин термостатують при 37°C. Для протеолізу використовують ензимний препарат – панкреатин. Використовують ензим:субстратне співвідношення 1:20 (кількість ензимного препарату розраховують по протеїну, який є у розчині субстрату, з врахуванням попередньо визначеної протеолітичної активності ензимного препарату). Ензимний препарат вносять у розчин протеїнів сироватки при перемішуванні. Для аналізу вмісту продуктів протеолізу через кожні 30 хвилин від моменту

внесення ензимного препарату відбирають 3 мл реакційного середовища в чисті пробірки, додають 3 мл 10% ТХО для осадження нерозщеплених протеїнів. Отриманий осад відфільтровують. Фільтрат, який містить розчинні продукти протеолізу, розводять в десять раз 5%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  і визначають оптичну густину при довжині хвилі 280 нм на спектрофотометрі СФ-46. Результати протеолізу представляють у вигляді графіку залежності оптичної густини гідролізату від часу.

Після двох годин протеолізу проводять відділення низькомолекулярної фракції продуктів протеолізу шляхом гель-фільтрації на колонці із сефадексом G-25 («Pharmacia», Швеція). Для цього на колонку (2×70см) із набору для рідинної хроматографії фірми «Reanal» (Угорщина) наносять 5 мл відфільтрованого гідролізату сироваткових білків. У фракції відбирають по 5 мл елюату. Вміст продуктів протеолізу у відібраних фракціях аналізують спектрофотометрично при 280 нм. Будують хроматограму, на якій відзначають низькомолекулярну фракцію, що містить біологічно активні пептиди. На основі аналізу побудованої хроматограми відбирають фракції, об'єднанням яких отримують комплексний препарат біологічно активних препаратів.

### **Контрольні запитання**

1. Які фракції містять протеїни сироватки?
2. Які відмінності між білками сироватки і казеїнами молока?
3. Вкажіть стадії виділення біоактивних пептидів з протеїнів сироватки молока?
4. Охарактеризуйте етапи виділення комплексного препарату біологічно активних препаратів з протеїнів сироватки молока з використанням панкреатину.





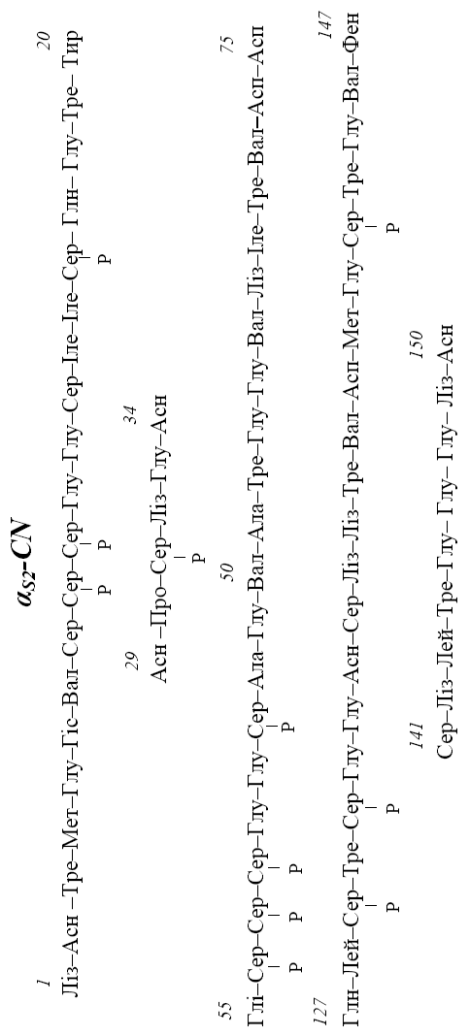


Рис. 4.2. Фрагменти первинної структури  $\alpha_{S2}-CN$  із фосфорильованими залишками

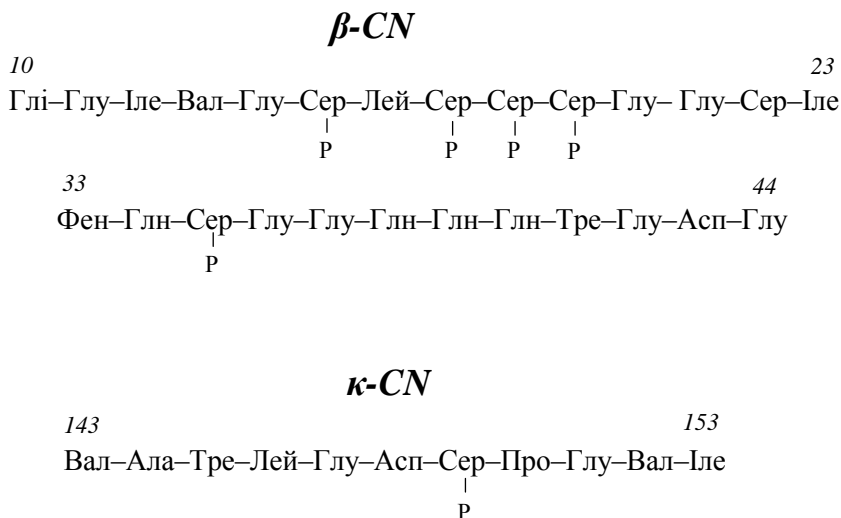


Рис. 4.3. Фрагменти первинної структури  **$\beta$ -CN і  $\kappa$ -CN**  
із фосфорильованими залишками

В будові різних фосфопептидів виявлено багато спільних ознак. Більшість з них містять три послідовно розміщені фосфосеринові залишки, за якими розташовані два залишки глутамінової кислоти (-СерР-СерР-СерР-Глу-Глу-). Така високополярна кислотна послідовність є основою металзв'язуючого сайту фосфопептидів.

Утворення біоактивних фосфопептидів залежить від специфічності протеолітичних ферментів та умов проведення протеолізу. При перетравлюванні фосфопротейнів у шлунково-кишковому тракті за дії ферментів утворюється ряд фосфопептидів. Виявлені фосфопептиди наведені у табл. 4.1.

Таблиця 4.1

## Казеїнові фосфопептиди

Ідентифіковані біоактивні пептиди	Вид біологічної активності	Ідентифіковані фрагменти
$\beta$ -CN (f1-25)4P	Зв'язування мінералів, імуномодуляторна	(f12-17)1P; (f12-25)3P; (f12-25)4P; (f15-25)2P; (f15-25)3P; (f19-25)1P; (f19-25)2P
$\beta$ -CN (f29-41)1P	Зв'язування мінералів	(f33-42)1P; (f33-43)1P; (f33-44)1P
$\alpha$ s1-CN	Зв'язування мінералів	(f110-119)1P
$\alpha$ s1-CN	Зв'язування мінералів	(f41-55)1P; (f68-79)2P
$\alpha$ s2-CN	Зв'язування мінералів	(f138-146)1P
$\alpha$ s2-CN	Зв'язування мінералів	(f124-137)2P; (f126-136)2P; (f126-137)2P

Біологічна роль фосфопептидів тісно пов'язана з проблемою карієсу зубів. Карієс зубів виникає при демінералізації їх твердих тканин органічними кислотами різного походження (кислоти їжі або кислоти, продуковані каріогенними бактеріями при ферментації вуглеводів). Встановлено, що фосфопептиди можуть брати участь у відновленні мінерального складу зубів і таким чином запобігати розвитку карієсу.

У зв'язку з цим фосфопептиди казеїнового походження є перспективними інгредієнтами для створення функціональних продуктів.

## Експериментальна частина

Матеріали, реактиви, обладнання: технічна вага, аналітична вага, рН-метр, спектрофотометр СФ-46, сушильна шафа, водяний

термостат, центрифуга, центрифужні пробірки, центрифужна вага, конічні колби, хімічні склянки, пробірки, піпетки на 1, 5 мл, мірний циліндр на 25 мл, скляні лійки, фільтрувальний папір, загальний казеїн, ензимні препарати (панкреатин, папаїн, нейтральна протеаза), дистильована вода, 1 Н NaOH, 1 Н HCl, 10%  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  (ТХО), 5 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 10%  $\text{CaCl}_2$ , етанол.

### **Хід роботи**

Приготування розчину субстрату. Загальний казеїн виділяють із свіжого молока, як описано у лабораторній роботі №1. З отриманого казеїну готують 2% розчин у дистильованій воді з додаванням 1 Н NaOH до значення рН 7,9. Концентрацію розчину розраховують спектрофотометричним методом в ультрафіолетовій області на спектрофотометрі СФ-46. При цьому використовують відомий коефіцієнт поглинання загального казеїну ( $D_{1\text{см}}^{1\%}$ ) – 8,2.

Проведення протеолізу. Розчини 2% казеїну вносять у 3 склянки по 25 мл в кожну і термостатують при 37°C. Для протеолізу казеїну використовують три ензимні препарати – панкреатин, папаїн, нейтральну протеазу (панкреатин – тваринного походження, папаїн – рослинного, нейтральна протеаза – мікробіологічного). Використовують ензим:субстратне співвідношення 1:20, враховуючи попередньо визначену протеолітичну активність ензимних препаратів.

Ензимні препарати вносять при перемішуванні у розчин казеїну. Через 60 і 120 хвилин в окремі чисті пробірки відбирають по 3 мл з кожного реакційного середовища і додають до них по 3 мл 10% ТХО для осадження нерозщеплених протеїнів. Отриманий осад відфільтровують. Фільтрат, який містить розчинні продукти протеолізу, розводять в десять раз 5%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  і визначають оптичну густину при довжині хвилі 280 нм. Результати протеолізу представляють у вигляді графіку залежності оптичної густини гідролізату від часу.

Виділення фосфопептидів. Після двох годин протеолізу із кожної реакційної суміші відбирають по 9 мл гідролізату. Доводять рН до 4,6 і відцентрифугують нерозщеплені протеїни. Потім до

центрифугату додають 1 мл 10 %  $\text{CaCl}_2$  і 10 мл етанолу. Осад фосфопептидів відцентрифугують, промивають етанолом, висушують до постійної ваги при  $70^\circ\text{C}$  у термостаті та зважують.

За отриманими результатами визначають вихід фосфопептидів при використанні ензимних препаратів тваринного, рослинного і мікробіологічного походження.

### **Контрольні запитання**

1. Які функції в організмі людини виконують фосфопептиди?
2. Які ферментні препарати використовують для виділення фосфопептидів?
3. Охарактеризуйте основні стадії виділення фосфопептидів?

### **Список посилань**

1. Park Y.W. Bioactive components in milk and dairy products / Y.W.Park - USA: Wiley-Blackwell, 2009. – 426 p.
2. Corredig M. Dairy-derived ingredients: food and nutraceutical uses / M.Corredig - USA: CRC Press, 2010. – 690 p.
3. Юкало А.В. Протеїни казеїнового комплексу молока корів (*Bos taurus*) як попередники біологічно активних пептидів / А. В. Юкало, Л.А. Сторож, В.Г. Юкало // Біотехнологія. – 2012. – Т 5, № 4.– С.21– 33.
4. Юкало А.В. Біоактивні пептиди з протеїнів сироватки молока корів (*Bos taurus*) / А.В. Юкало, К.Є. Дацишин, В.Г. Юкало // Біотехнологія. – 2013. – Т 6.– 31 с.

## Зміст

<b>Вступ.....</b>	<b>3</b>
<b>Лабораторна робота №1</b>	
Виділення попередників біоактивних пептидів з протеїнів казеїнового комплексу осадженням.....	4
<b>Лабораторна робота №2</b>	
Препаративний електрофорез білків молока.....	10
<b>Лабораторна робота №3</b>	
Отримання комплексних препаратів біоактивних пептидів із протеїнів сироватки молока.....	17
<b>Лабораторна робота №4</b>	
Виділення біоактивних фосфопептидів.....	25
<b>Список посилань.....</b>	<b>31</b>